

MESA TEMÁTICA: Caracterización, dinámica y biodiversidad de los ecosistemas forestales

EFECTO SOBRE LA FLUORESCENCIA DE LA CLOROFILA DE HOJAS DE ARRACLÁN (FRANGULA ALNUS) CRECIENDO EN SOTOBOSQUE DE ROBLEDALES ATLANTICOS SOMETIDOS A DISTINTOS PESOS DE CLARA

C. López-Sors Cano, F.J. Silva-Pando y Luis Sanpedro Pérez

Centro de Investigaciones Forestais e Ambientais de Lourizán. Centro de Desenvolvemento Sostible. Consellería de Medio Ambiente. Xunta de Galicia.
Apdo. 127. CP 36080 Pontevedra.
Correo electrónico: sors.cifal@siam-cma.org

Resumen

Se estudiaron las reacciones de adaptación del aparato fotosintético a las distintas condiciones de iluminación tras la realización de tratamientos de clara y en dos localidades, Cotobade y Labio, en parcelas experimentales de roble, y se compararon los resultados con las parcelas control (C), sin tratamiento, empleando como herramienta de investigación la fluorescencia de la clorofila, descubierta en 1931 por Kautsky & Hirsch. Los parámetros que se han analizado son el: rendimiento cuántico fotoquímico potencial de PSII (ϕ_{PSII}), productividad cuántica basal de los procesos no fotoquímicos de PSII (ϕ_{No}), el coeficiente de atenuamiento fotoquímico (qP), la eficiencia cuántica máxima de la energía de conversión de PSII (ϕ_2), y el índice de estabilidad (Rdf). Tras el análisis de los datos se observó que el resultado de los tratamientos afectaba de forma distinta a las masas situadas en las dos localizaciones, pues mientras que en Cotobade son los tratamientos más intensos los que obtienen una mejor respuesta del aparato fotosintético de la planta para la mayoría de los parámetros, en Labio son los tratamientos menos intensos los que reflejan ese comportamiento, siempre resultando la variable tratamiento significativa en los parámetros estudiados.

Palabras clave: adaptación, aparato fotosintético, niveles de radiación, *Quercus robur*

EFECTO SOBRE LA FLUORESCENCIA DE LA CLOROFILA DE HOJAS DE ARRACLÁN (FRANGULA ALNUS) CRECIENDO EN SOTOBOSQUE DE ROBLEDALES ATLANTICOS SOMETIDOS A DISTINTOS PESOS DE CLARA

C. López-Sors Cano, F.J. Silva-Pando y Luis Sanpedro Pérez

Centro de Investigaciones Forestais e Ambientais de Lourizán. Centro de Desenvolvemento Sostible. Consellería de Medio Ambiente. Xunta de Galicia.
Apdo. 127. CP 36080 Pontevedra.
Correo electrónico: sors.cifal@siam-cma.org

INTRODUCCIÓN

Las formaciones dominadas por el roble pedunculado o carballo (*Quercus robur* L.) constituyen los bosques climácicos que ocuparían la mayor parte del territorio gallego, desde el nivel del mar hasta unos 1200-1300 m de altitud. Los aprovechamientos más habituales de los robledales

son la entresaca por huroneo de los ejemplares más desarrollados y el trasmocho de los pies para la obtención de leñas (DÍAZ-MAROTO, 1997).

Los robledales gallegos han sido estudiados fundamentalmente desde los puntos de vista botánico y ecológico, pero a pesar de ello no existe ningún estudio de este tipo de ecosistema con una perspectiva integral. Estudios como los de IZCO *et al.* (1990), SILVA-PANDO Y RIGUEIRO (1992) y DÍAZ-MAROTO (1997) pueden considerarse los más sintéticos.

La fluorescencia de la clorofila es una poderosa herramienta en la investigación de la fotosíntesis, pues puede detectar reacciones de estrés en la planta y darnos una idea sobre su estado fisiológico, además de presentar la ventaja de ser una técnica no destructiva para la planta (KRAUSE & WEIS, 1991). Esta técnica ha sido empleada de forma bastante extendida para conocer los efectos de la fotoinhibición y la respuesta a condiciones de sequía para algunas especies. En España existen escasas publicaciones recientes, como la de NAVARRO *et al.* (2004), estudiando la respuesta al estrés hídrico moderado de cinco procedencias de *Pinus halepensis* Mill. Pocos son los trabajos publicados sobre fluorescencia de la clorofila como herramienta de medición de los procesos fotosintéticos para *Quercus robur*, entre los que podemos citar MORECROFT *et al.* (2003); solo encontramos un trabajo publicado, VALLADARES *et al.* (2002), sobre el empleo de estos parámetros para reflejar cambios ecofisiológicos debido a la exposición a diferentes niveles de radiación para esta especie.

El objetivo de este trabajo es conocer la influencia de la modificación de la cobertura arbórea en la respuesta ecofisiológica de las plantas del sotobosque, más en concreto sobre la adaptación del aparato fotosintético a las distintas intensidades de luz después de una clara. Como especie propia del sotobosque se ha elegido el arraclán (*Frangula alnus* L.), esta es la única leñosa que crece en el sotobosque de todas las parcelas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las parcelas de estudio corresponden a un ensayo de claras en masas naturales regulares de *Quercus robur* en dos localidades de Galicia (Insuela-Cotobade, Pontevedra y Labio, Lugo). La especie dominante en ambas estaciones es el roble, con sotobosque abundante de arraclán, *Frangula alnus* L. Otras características se resumen en la Tabla 1.

En 1999 se instalaron 12 parcelas permanentes de 40 × 40 m en el caso de Labio y de 30 x 30 m en Cotobade, con dos de sus lados paralelos siguiendo la línea de máxima pendiente y una distancia mínima de 10 m entre parcelas según las recomendaciones establecidas por GANDULLO (1992) y MADRIGAL *et al.* (1992). En 1999 se aplicaron en Cotobade cuatro tratamientos de clareo consistentes en la eliminación del 0% (C), 15% (L), 35% (M) y 55% (H) del área basimétrica inicial de roble siguiendo un diseño de bloques aleatorios. Los mismos tratamientos fueron aplicados de la misma forma en Labio en 2000.

La toma de muestras para la medida de fluorescencia se realizó antes del amanecer, en el mismo día en todas las parcelas de cada localidad, mediante recogida de ramillas de 15 cm, con varias hojas, en 5 plantas por parcela. Las muestras fueron transportadas al laboratorio en condiciones de oscuridad y las mediciones se efectuaron dentro de la hora siguiente a su recogida. Los muestreos se realizaron en junio de 2003 y 2004.

Los parámetros de fluorescencia en la fase oscura se midieron con el MINI-PAM. En el año 2003 solo se midió la fluorescencia en la fase oscura, colocando la superficie de la hoja a una distancia de 12 mm de la fibra óptica. En 2004 se incorporó una pinza de sujeción de la hoja con fuente de luz actínica (leaf-clip holder Walz) que permitió la medición de otros parámetros de fluorescencia en condiciones de iluminación.

En el presente trabajo se analizarán los siguientes parámetros: el rendimiento cuántico fotoquímico potencial de PSII (Φ_{PSII}) = $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$ (BJÖRKMAN & DEMMIG, 1987), donde F_m y F_o son, respectivamente, el valor máximo y mínimo de la fluorescencia de la clorofila en adaptación a la oscuridad; el rendimiento de No o productividad cuántica basal de los procesos no fotoquímicos de PSII (Φ_{No}) = F_o/F_m ; el coeficiente de atenuamiento fotoquímico de

$F_m' a F_s (qP) = \frac{F_m' - F_s}{F_m' - F_o'}$ (SCHREIBER *et al.* 1986, GENTY *et al.* 1989), donde F_m' es el

máximo valor de fluorescencia de la clorofila en condiciones de adaptación a la luz, F_s es el valor estable de fluorescencia en adaptación a la luz y F_o' es el valor mínimo de la fluorescencia de la clorofila en adaptación a la luz; la eficiencia cuántica máxima de la energía de conversión de PSII $(\Phi_2) = \frac{F_m' - F_s}{F_m'}$, y el índice de estabilidad $Rdf = \frac{F_p - F_s}{F_p}$, donde F_p es el máximo valor de fluorescencia en el momento de encender la luz actínica.

Para el análisis estadístico de los resultados, y debido a la pérdida del etiquetado de las plantas por acción del ganado, se tomó como valor de cada parcela el promedio de las mediciones en las cinco plantas, y se aplicó un modelo GLM de medidas repetidas considerando sitio y tratamiento como variables entresujeto y año como variable intrasujeto. Todos los datos se analizaron con el programa STATISTICA 6.0®, con un criterio de significación de $\alpha < 0.05$ considerando las p ajustadas si no se cumple el criterio de esfericidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parámetros de fluorescencia en la oscuridad

Como resultado del análisis, para la variable Φ_{PSII} , las variables independientes año, sitio y tratamiento han resultado significativas, pero no sus interacciones.

En Cotobade (Figura 1), el único tratamiento de clara donde encontramos mayores valores de este parámetro es en el tratamiento más intenso (H), con valores significativamente distintos a los que se midieron en las parcelas de más baja intensidad de tratamiento (L). Los valores del rendimiento cuántico fotoquímico para el tratamiento de intensidad media (M) se acerca mucho a los valores que encontramos en las parcelas control (C), quedando por debajo los valores de las parcelas con tratamiento de baja intensidad de clara (L). En Labio, por el contrario, observamos que el tratamiento de clara no produce cambios significativos en los valores de este parámetro, y son las parcelas control las que reflejan mayores valores del Φ_{PSII} (Figura 1), además el Φ_{PSII} ha sido significativamente menor en Labio comparado con los valores medidos en Cotobade.

A pesar de que todos los valores de este parámetro se encuentran en el rango de valores de plantas sanas (0,79-0,84) (BJÖRKMAN & DEMMIG, 1987), se observó una inversión del sentido de evolución de los valores medios de Φ_{PSII} en el año 2004 en las parcelas aclaradas con intensidad media (M) y alta (H) en Labio, al contrario que ocurre en Cotobade, donde, a pesar de disminuir todos los valores de Φ_{PSII} en todos los tratamientos, la tendencia se mantiene (Figur 2). Esto puede ser debido a que estamos midiendo la fluorescencia de la clorofila en plantas que, en este caso, están sometidas a unas condiciones de más baja iluminación que en el caso de Cotobade, debido a la mayor densidad en pies/ha que presentan las parcelas de Labio para este tipo de claras, con respecto a las parcelas análogas en Cotobade, pues de esta manera las plantas de Labio están más adaptadas a condiciones de baja irradiación y la eficiencia del PSII ante alta irradiación disminuye en mayor medida que plantas adaptadas a condiciones de mayor irradiación. Por otra parte la mayor edad de las masas de Labio en el momento de la clara puede resultar significativa ecológicamente, pues las claras tardías pueden implicar una menor capacidad de reacción de los pies a las nuevas condiciones de iluminación, sobre todo en caso de claras muy fuertes. Los valores obtenidos en estas mediciones son muy similares a los medidos en el trabajo de VALLADARES *et al.* (2002) para las plántulas de roble bajo diferentes mallas de sombreo.

Para plantas estresadas este valor de Φ_{PSII} es muy inferior, por lo tanto, Φ_{PSII} se emplea como indicador de fotoinhibición u otra clase de daños causados en los complejos PSII (e.j. REES *et al.*, 1990; KRAUSE & WEIS, 1991; BUFFONI *et al.*, 1998; LAZÁR & NAUS, 1998), por lo que las plantas medida en nuestra experiencia no se encuentran sometidas a estrés.

Para Φ_{No} , el año, el sitio y el tratamiento resultan significativos. Los valores medios de los tratamientos en Labio se encuentran fuera del rango de valores que para este parámetro definen a las plantas sanas y sin estrés (0,14-0,2), sin embargo, en Cotobade, solo el tratamiento de menor intensidad presenta valores fuera de este rango, posiblemente debido a la menor edad de los pies en estas parcelas (Figura 3). En 2004, en Labio, los valores medios de Φ_{No} aumentan en las parcelas

sometidas a mayor intensidad (H, M), y solo en las parcelas control (C) existe una disminución en los valores medidos, situándose la media de los valores muy próximo a 0,2. En plantas estresadas o dañadas esta relación aumenta marcadamente (BILGER *et al.* 1987, HORTON & RUBAN, 1992), por lo que se emplea como indicador del estrés de las plantas, esto permite determinar la presencia de algún tipo de estrés en las parcelas con tratamientos más intensos de clara (H, M) cuatro años después de la realización de la clara en Labio. En Cotobade, sin embargo, son las parcelas de tratamiento más intenso (H) las que responden mejor respecto a este parámetro, pues además de situarse dentro del rango de valores óptimos en el año 2004, es el tratamiento que experimenta un aumento menor de este parámetro entre los dos años de estudio, pues, a pesar de que en los tratamientos C y M también los valores de ϕ_{No} se encuentran dentro del rango (0,14-0,2), el aumento de los valores en el año 2004 los sitúa en el límite superior del rango. El tratamiento de menor intensidad (L), en Cotobade, es el único que presenta valores de ϕ_{No} algo superiores al rango que muestra plantas no estresadas, por lo que los pies de esa parcela probablemente se vieron sometidos a algún tipo de estrés.

Parámetros de fluorescencia en condiciones de iluminación con luz actínica

El coeficiente de atenuación fotoquímico (qP) de la fluorescencia es un parámetro que declina progresivamente a medida que aumenta el estrés, tomando valores entre 0 y 1, indicando la capacidad fotosintética de PSII en condiciones de iluminación y cuantificando la fracción de los centros de reacción de PSII que están abiertos (DUYSENS & SWEERS, 1963; KRAUSE *et al.*, 1982). El coeficiente de atenuación fotoquímico refleja variaciones significativas en función de la intensidad de clara (Figura 4). Los tratamientos más intensos (H, M) presentan mayores valores de este parámetro, con diferencias significativas respecto de los valores del coeficiente de atenuamiento en las parcelas sometidas a tratamiento de menor intensidad (L). El aparato fotosintético parece responder más eficientemente en estas parcelas más intensamente aclaradas, posiblemente debido a la apertura del dosel y la formación de huecos en el mismo, con el consecuente aumento de radiación PAR que alcanza el sotobosque, pudiendo favorecer, esas condiciones de luz directa, el incremento de los valores de qP. Los valores de qP en Labio son significativamente mayores en el tratamiento de intensidad media (M) que los del mismo tratamiento en Cotobade, siendo este, el tratamiento que mayores valores de este parámetro presenta, mientras que en Cotobade es el tratamiento de más intensidad (H).

La eficiencia cuántica máxima de la energía de conversión de PSII (ϕ_2) está muy relacionado con qP y se comportan de forma paralela, como cabría esperar, ya que ambos parámetros están relacionados de una u otra manera con la actividad los centros de reacción de PSII, sin embargo el tratamiento no ha resultado significativo.

El tratamiento y su interacción con la variable sitio han resultado significativos para el índice de estabilidad. En Labio y en Cotobade, los valores que toma este parámetro (1,5-3,8) corresponden a plantas sanas y sin estrés, ya que esta variable puede tomar valores entre 0 y $+\infty$, pero toma valores entre 1 y 5 cuando se mide a alta radiación (HAITZ & LICHTENTHALER, 1988). El índice de estabilidad (Rdf) es la relación de decrecimiento de los valores de la fluorescencia hacia un estado estable de emisión, que fue introducido para cuantificar procesos de fotosíntesis en las plantas (BROWN, 1967; LICHTENTHALER *et al.*, 1984, 1986), y tiene en cuenta la máxima fluorescencia medida en el momento de encender la luz actínica (Fp) y el estado estable alcanzado en adaptación a la luz (Fs). Ha sido típicamente empleado para medir la relación de asimilación de CO₂ y el contenido de clorofila en plantas superiores (LICHTENTHALER *et al.*, 1986; LICHTENTHALER, 1988) y el aumento de este parámetro se pueden interpretar como una disminución de ϕ_{PSII} , por lo que las parcelas que más eficiencia fotoquímica presentan son en ambas localizaciones las parcelas sometidas a tratamiento menos intenso (L).

Como conclusión, podemos establecer que, en función de los parámetros estudiados, la clara favorece el estado ecofisiológico de la planta. El análisis de los parámetros de fluorescencia medidos en oscuridad se pueden interpretar de forma generalizada, pero para los parámetros de fluorescencia medidos en condiciones de iluminación, la intensidad de tratamiento que más favorece a la especie tiene que ser estudiado en cada localización concreta, pues son muchos los factores que influyen en el estado de una masa forestal y es difícil encontrar ubicaciones con idénticas condiciones para una

masa tanto desde el punto de vista estructural como ecológico. Las hojas se adaptan con el tiempo (varios años después de la clara) a las condiciones de luz reinantes en cada ambiente, aumentando su eficiencia fotosintética potencial al desarrollarse en ambientes con más luminosidad.

Agradecimientos

Los resultados expuestos en este trabajo se han obtenido en el marco de los proyectos “Efecto de las claras en robledal. Estimación estacional de diversos parámetros edáficos y foliares” PGIDT00MAM50201PR y “Efectos de la claras y la apertura de huecos en el crecimiento y la regeneración de *Quercus robur* L. en el Noroeste Peninsular” INIA-SC98-062, financiados por la Xunta de Galicia y el Instituto Nacional de Investigaciones Agroalimentarias, respectivamente.

Los autores agradecen a M^a José Rozados su colaboración.

BIBLIOGRAFÍA

- BILGER, W.; SCHREIBER, U. & LANGE, O.L.; 1987. Chlorophyll fluorescence as a indicator of heat induced limitation of photosynthesis in *Arbutus unedo* L. In: J. D. Tenhunen; F.M. Catarino; O.L. Lange; W.C. Oechel (eds), *Plant Response to Stress*. 391-399. Springer. Berlín.
- BJÖRKMAN, O. & DEMMIG, B.; 1987. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170: 489-504.
- BROWN, J.S.; 1967. Fluorometric evidence for the participation of chlorophyll a-695 in System 2 of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 143: 391-398.
- BUFFONI, M.; TESTI, M.G.; PASARESI, P.; GARLASCHI, F.M. & JENNINGS, R.C.; 1998. A study of the relation between CP29 phosphorylation, zeaxanthin content and fluorescence quenching parameters in *Zea mays* leaves. *Physiol. Plant.* 102: 318-324.
- DIAZ-MAROTO HIDALGO, I.J.; 1997. *Estudio ecológico y dasométrico de las masas de carballo (Quercus robur L.) en Galicia*. Tesis doctoral (inéd.). Universidad Politécnica de Madrid. Madrid.
- DUYSENS, L.N.M. & SWEERS, H.E. ; 1963. Mechanism of two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence. *Proc. R. Soc. Biol.* 157: 301-310.
- GANDULLO, J.M.; 1992. Estudio ecológico de la laurisilva Canaria. *Colección Técnica ICONA* 17: 5-189.
- GENTY, B.; BRIANTAIS, J-M. & BAKER, N.R.; 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthesis electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta.* 990: 87-92.
- HAITZ, R., LIECHTENTHALER, H.K.; 1988. The measurements of Rdf values as plant vitality indices with the portable field chlorophyll fluorometer and the PAM-fluorometer. In: H.K. Lichtenthaler (ed.), *Applications of Chlorophyll Fluorescence*: 249-254. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- HORTON, P. & RUBAN, A.V.; 1992. Regulation of Photosystem II. *Photosynth. Res.* 34: 375-385.
- IZCO, J.; AMIGO, J. & GUITIAN, J.; 1990. Los robledales galaico-septentrionales. *Acta Botánica Malacitana* XV: 267-276.
- KRAUSE, G.H.; VERNOTTE, C. & BRIANTAIS, J.M.; 1982. Photoinduced quenching of chlorophyll fluorescence in intact chloroplasts and algae. Resolution into four components. *Biochim. Biophys. Acta* 679: 116-124.
- KRAUSE, G.H. & WEIS, E.; 1991. Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics. *Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 313-349.
- LAZÁR, D. & NAUS, J.; 1998. Statistical properties of chlorophyll fluorescence induction parameters. *Photosynthetica* 35: 121-127.
- LICHTENTHALER, H.K.; MEIER, D. & BUSCHMANN, C.; 1984. Development of chloroplast at high and low light quanta fluorescence rates. *Isr. J. Bot.* 33: 185-194.
- LICHTENTHALER, H.K.; BUSCHMANN, C.; RINDERLE, U. & SCHMUCK, G.; 1986. Application of chlorophyll fluorescence in ecophysiology. *Radiat. Environ. Biophys.* 25: 297-308.

- LICHTENTHALER, H.K.; 1988. *In vivo* chlorophyll fluorescence as a tool for stress detection plants. In: H.K. Lichtenthaler (ed.), *Applications of Chlorophyll Fluorescence*. 129-142. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht .
- MADRIGAL, A.; PUERTAS, F.; MARTÍNEZ MILLÁN, J.; ERASO, F., IZCO, F. & OMAR, A.; 1992. Estudio de claras en masas regulares de hayedos en la Comunidad Foral de Navarra. *Inv. Agr. Sist. Rec. For.* 1: 213-229.
- METEOGALICIA. Anuario climatolóxico de Galicia 2002. Colección Técnica de Medio Ambiente. XUNTA DE GALICIA.
- MORECROFT, M. D.; STOKES, V. J. & MORISON, J. I. L.; 2003. Seasonal changes in the photosynthetic capacity of canopy oak (*Quercus robur*) leaves: the impact of slow development on annual carbon uptake. *Int. J. Biometeorol* 47(4): 221-226.
- NAVARRO CERRILLO, R.M.; MALDONADO-RODRÍGUEZ, R. & ARIZA MATEOS, D.; 2004. Chlorophyll fluorescence in five procedences *Pinus halepensis* Mill to quantify response to water stress. *Cuad. Soc. Esp. Cien. For.* 17: 69-74.
- REES, D.; NOCTOR, G.D. & HORTON, P.; 1990. The effects of high-energy-state excitation quenching on maximum and dark level chlorophyll fluorescence yield. *Photosynth. Res.* 25: 199-211.
- SCHREIBER, U.; SCHLIWA, U. & BILGER, W.; 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth. Res.* 10: 51-62.
- SILVA-PANDO, F.J. Y RIGUEIRO RODRIGUEZ, A.; 1992. *Guía das árbores e bosques de Galicia*. Ed. Galaxia. Vigo.
- VALLADARES, F.; CHICO, J.; ARANDA, I.; BALAGUER, L.; DIZENGREMEL, P.; MANRIQUE, E. & DREYER, E.; 2002. The greater seedling high-light tolerance of *Quercus robur* over *Fagus sylvatica* is linked to a greater physiological plasticity. *Trees* 16(6): 395-403.

Nº	Localidad	Año de clara	Especie dominante	Altitud (m)	Temp. media anual (°C)	Prec. media anual (mm)	Sustrato
1	Labio	1999	<i>Q. robur</i>	667	110,4	1296	Granitos
2	Cotobade	2000	<i>Q. robur</i>	400	112,5	2752	Granitos

Tabla 1. Caracterización de las zonas de medición.

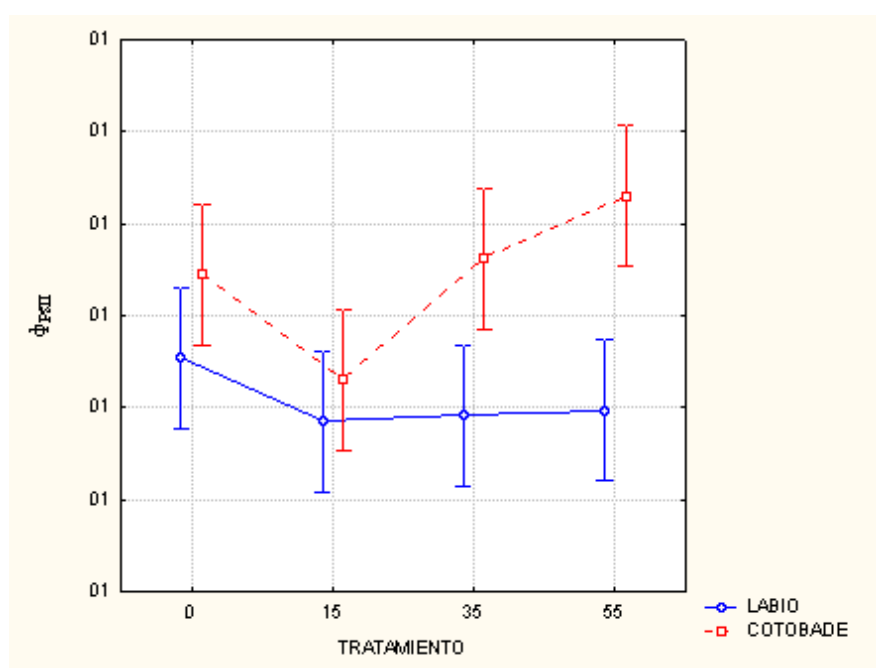


Figura 1. Rendimiento fotoquímico potencial de PSII (ϕ_{PSII}) en Cotobade y Labio.

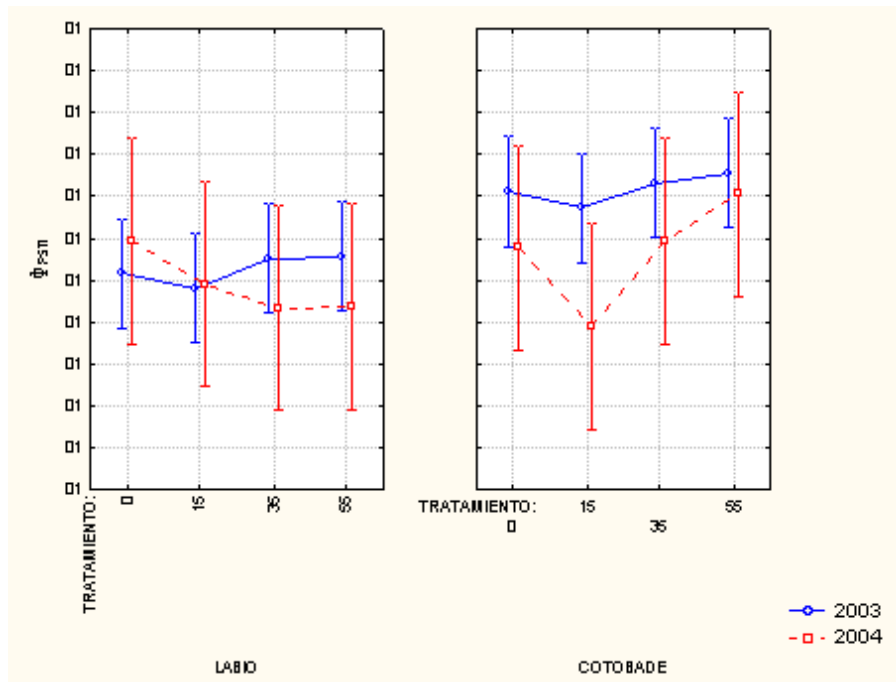


Figura 2. Valores del rendimiento fotoquímico potencial de PSII (ϕ_{PSII}) para los años 2003-2004 en Cotobade y Labio.

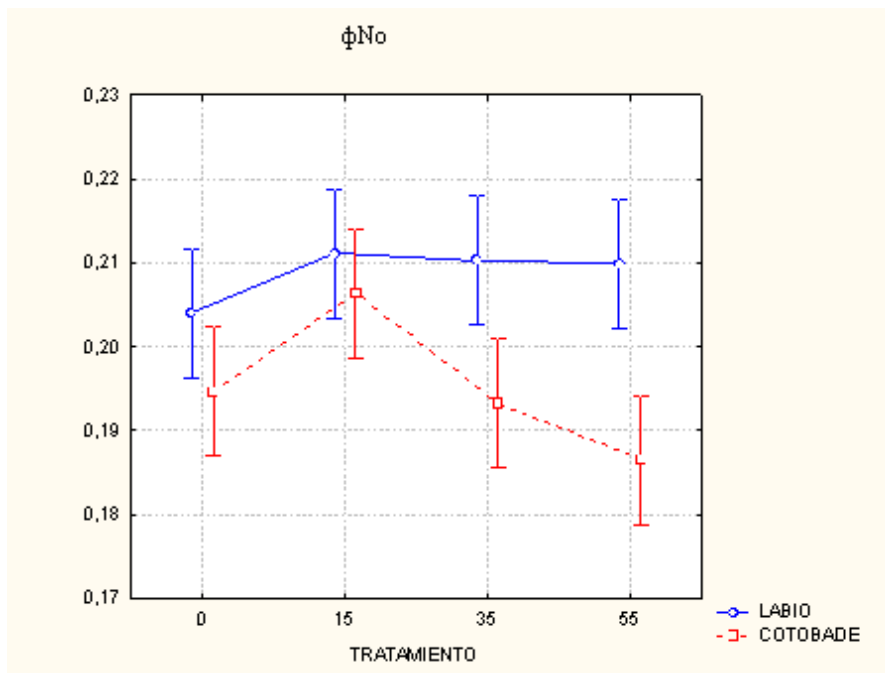


Figura 3. Valores de ϕ_{No} en Cotobade y Labio para los distintos tratamientos de clara 15% (L), 35% (M), 55% (H) y parcelas control 0% (C).

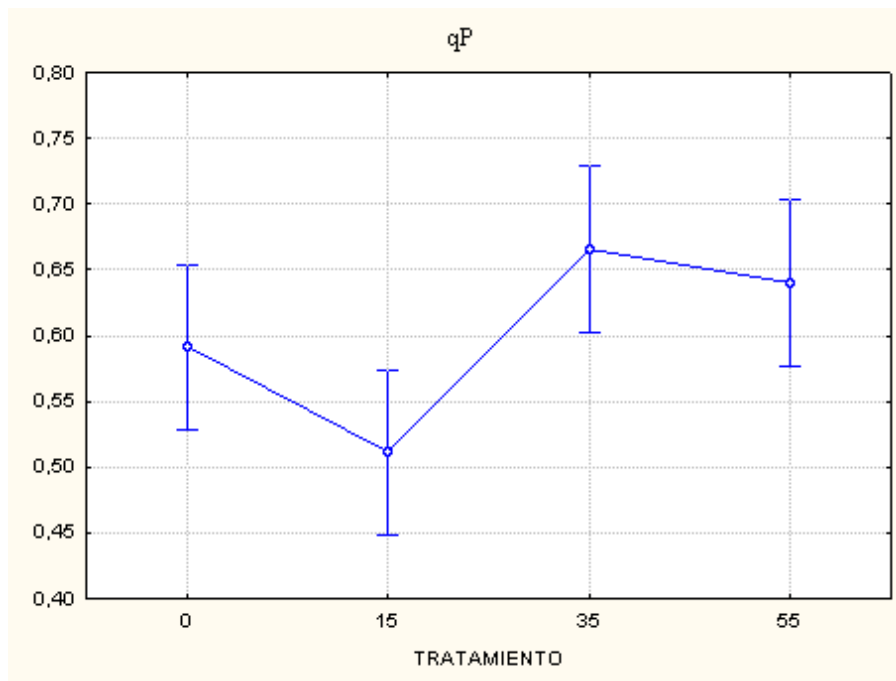


Figura 4. Valores del coeficiente de atenuamiento de la fluorescencia (qP) en Cotobade y Labio.